

2012 年度 修士論文要旨

## ラマン分光法を用いた神経細胞の機能と 分子組成変化の相関解析

関西学院大学大学院理工学研究科  
生命科学専攻 佐藤研究室 橋本 剛佑

脳の基本構成単位である神経細胞はシナプスを介して互いにつながり合うことで神経回路網を形成する。平面微小電極を用いた電気生理学的手法により、培養を開始してからおよそ 10 日後に自発的な電気活動の発現が見られ、およそ 60 日後に高頻度の自発活動の同期現象が確認された[1]。これは神経細胞の培養日数に伴う成熟、新たな機能の発現を培養環境で観測されたことを意味するが、神経細胞の成熟に伴う機能獲得に関連して細胞内の分子組成がどのように変化しているかは不明である。今後、培養神経回路網を用いた情報処理機構を分子レベルで解析を行うためには個々の神経細胞の分子情報を知る必要であると考えられる。ラマン分光法は振動分光法の一つで空間分解能が比較的高く( $\sim 1\ \mu\text{m}$ )、侵襲性の低い分析手段であり、ケモメトリックスと併用することでラマンスペクトルの形状から判断できない分子組成の微小な変化を解析することが可能である。本研究は脳神経研究の新たなツールとしてのラマン分光法の確立を最終目標とする。ラット胎児の海馬から得られた神経細胞の培養日数依存的な細胞内分子組成の変化をケモメトリックスの一種である部分最小二乗回帰分析 (Partial Least Squares Regression; PLSR)を用いて解析した。

培養 2～90 日目の神経細胞の核のスペクトルの形状に大きな違いは観測されなかった。PLSR 解析を実施し、Factor 1, 2 を用いて培養日数の検量モデルを作成した。それぞれの培養日数においてプロットの分散は大きいにもかかわらず、培養 2 日目、8～45 日目、60～90 日目の 3 つの大きなグループに判別された。このことから神経細胞内では培養日数の経過に伴い二段階の大きな分子組成の変化を起こす可能性が示唆された。また、Leave-one-out Cross Validation を行い、作成した検量モデルの精度を検証したところ、全ての測定データが検量モデル中のそれぞれ属すべきグループのデータとして判定され、精度の良い検量モデルを作成できた可能性が示唆された。Factor 1, 2 のスコア値をもとに作成したスコアプロットでは培養 60 日目以降のデータが第一象限に広く分散している一方で、培養 2 日目のデータは第三象限に、培養 8～45 日目のデータ第二象限に広く分散しており、作成した検量モデルにおけるデータの分散を良く反映した結果となった。細胞内で生じた変化を Factor 1, 2 のローディングプロットから解析した。Factor 1 のローディングプロットはタンパク質のラマンスペクトルと形状が類似していた。1200, 1259  $\text{cm}^{-1}$  はアミドⅢの振動モードに帰属でき、1435, 1642  $\text{cm}^{-1}$  に正の方向に現れたバンドはそれぞれ CH 変角振動、アミド

I ( $\alpha$ -helix)の振動に帰属される. このことから **Factor 1** は $\alpha$ ヘリックスを多く含むタンパク質を示しており, 培養日数の経過に伴い **Factor 1** のスコア値が正の値へと変化する様子から, 細胞の成熟に伴い $\alpha$ ヘリックスが豊富なタンパク質が増加することが示唆された. **Factor 2** のローディングプロットは負の方向に DNA に帰属できるバンドが含まれていた. 以上のことから, 神経細胞の成熟の段階を判別する上で $\alpha$ ヘリックス構造に富んだタンパク質の割合と DNA の濃度変化が指標となる可能性が示唆された.

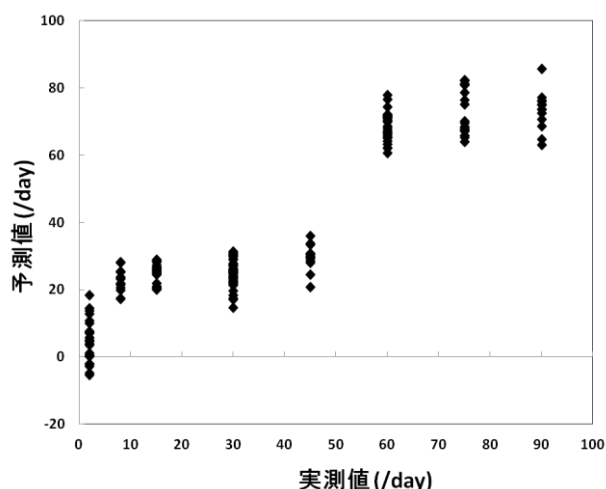


Fig.1 PLSR にて算出した **Factor 1, 2** を用いて作成した培養日数の実測値, 予測値の検量プロット.

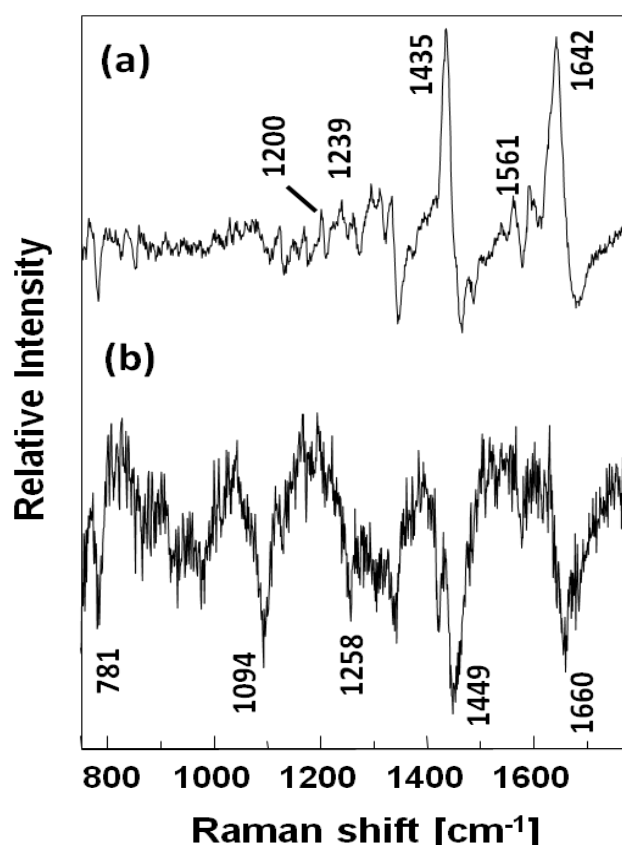


Fig.2 PLSR 解析で算出した各 **Factor** のローディングプロット. (a)は **Factor 1**, (b)は **Factor 2** のローディングプロットを示している.

#### 参考文献

- [1] 清原 藍, 田口隆久, 工藤 卓: "分散培養系における自発性活動電位と誘導活動電位との関係性", 電気学会論文誌 C(電子・情報・システム), **129**(10), pp.1815-1821, 2009.